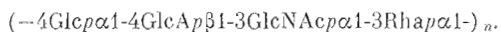




УДК 577.114.5:543.422.23:579.842.15.083.3

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ РОДА  
*SHIGELLA* \*.УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИСАХАРИДНОЙ  
ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA BOYDII*, ТИП 9,  
И ОБНАРУЖЕНИЕ НЕОБЫЧНОГО  
ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЛИКОЛИПИДА*Львов В. Л., Мусина Л. Ю., Шапков А. С.\*,  
Ермаков Г. П., Дмитриев В. А.**Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР, Москва;**\* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

При мягкой кислотной дегградации липополисахарида *Shigella boydii*, тип 9, получен О-специфический полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкозы, *D*-глюкуроновой кислоты, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и *L*-рамнозы. На основании данных анализа методом метилирования, частичного кислотного гидролиза и результатов полной расщипровки спектра <sup>13</sup>С-ЯМР полисахарида установлено строение его повторяющегося звена, которое представляет собой линейный тетрасахарид:



Липополисахарид *Sh. boydii*, тип 9, был разделен гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-200 в присутствии дезоксихолата натрия на три фракции. По данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектроскопии <sup>13</sup>С-ЯМР и ГЖХ-масс-спектрометрии, углеводным компонентом всех фракций является О-специфический полисахарид установленного строения с различной длиной полимерной цепи. Наиболее высокомолекулярный, по данным гель-хроматографии, препарат содержал аномально длинные О-цепи (~60 000 Да), и его жирнокислотный состав отличался от состава остальных выделенных липополисахаридов отсутствием β-оксимиристиновой кислоты.

Липополисахариды (ЛПС) S-форм грамотрицательных бактерий представляют собой популяции родственных макромолекул, которые могут различаться как числом повторяющихся звеньев в О-специфической полисахаридной цепи, так и элементами структуры полисахаридной цепи, олигосахарида кора и липида А вследствие их нестехиометрической модификации [2]. Важность определения типа гетерогенности обусловлена тем, что полисахаридная и липидная компоненты ЛПС являются носителями различных биологических свойств. Так, липид А активирует комплемент по классическому пути и обуславливает токсические свойства ЛПС, тогда как полисахаридная часть ЛПС играет основную роль в активации комплемента по альтернативному пути и проявлении О-антигенных свойств [3, 4].

Настоящая работа продолжает начатое нами ранее изучение ЛПС наружной клеточной мембраны бактерий *Shigella boydii* и содержит результаты установления структуры повторяющегося звена специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 9, а также данные об обнаружении и выделении высокомолекулярного О-антигенного компонента.

ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, был выделен из сухих бактериальных клеток по методике Вестфалия [5] с некоторыми изменениями, которые включали однократную экстракцию горячим водным фенолом с последующим диализом суммарного экстракта без разделения водного и фенольного слоев (см. [1]). Из полученного экстракта нуклеиновые кислоты удаляли

\* Предыдущее сообщение см. [1].

двумя способами: осаждением в виде соли с цетавлопом [5] или непосредственно осаждением при подкислении уксусной кислотой до pH 3,4 при 5–10° С. Очищенные обоими способами препараты ЛПС, по данным УФ-спектра, содержали не более 2–3% нуклеиновых кислот, однако по второму способу выход ЛПС был несколько выше (выходы составили 10,1 и 11,5% соответственно). Полученный ЛПС подвергли ультрацентрифугированию (1% раствор в воде, 105 000 g, 6 ч), выходы осадка и супернатанта составили 2,8 и 8,7% от веса сухих клеток.

Исследование ЛПС, полученных из супернатанта и осадка, методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [6] показало, что они практически идентичны и состоят из большого количества компонентов различной молекулярной массы (см. ниже, рис. 4, трек 1): группа полос с  $E_i$  0,5–0,7 соответствовала ЛПС с короткими O-специфическими цепями, тогда как частые полосы с  $E_i$  0,25–0,35 соответствовали более высокомолекулярным ЛПС [7]. Полученные ЛПС проявляли высокую серологическую активность в тесте торможения реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

Для выделения специфического полисахарида раствор суммарного ЛПС обрабатывали 1% уксусной кислотой 1,5 ч при 100° С, осадок липида отделяли центрифугированием, а из супернатанта хроматографией на колонке с сефадексом G-50 выделяли полисахарид (ПС1) с выходом 25–30% от веса ЛПС и олигосахаридную фракцию, которая далее не исследовалась. ПС1, по данным электрофореза на бумаге, оказался кислым. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре ПС1 (90° С,  $\text{D}_2\text{O}$ ) в области резонанса аномерных протонов присутствовали четыре сигнала: 5,45 (дублет,  $J_{1,2}$  3,8 Гц); 5,09 (дублет,  $J_{1,2}$  3,2 Гц); 4,97 (уширенный синглет,  $J_{1,2} < 2$  Гц); 4,60 м.д. (дублет, 7,5 Гц). Обнаружение в спектре трехпротоонных дублета при 1,35 м.д. ( $J_{5,6} \sim 6$  Гц) и синглета при 2,09 м.д. свидетельствовало о наличии остатков 6-дезоксисахара и N-ацетиламиносахара.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ПС1 содержал 26 сигналов (рис. 1, таблица), среди которых в области резонанса аномерных атомов углерода присутствовали четыре сигнала с химическими сдвигами 95,9; 100,0; 101,7; 103,7 м.д. В спектре, снятом в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия атомов углерода с протонами (GD-спектр), эти сигналы расщеплены в первом приближении в дублеты с  $^1J_{\text{H1-C1}}$  173,5; 171,8; 170,1; 163,6 Гц соответственно. Поскольку для аномерных атомов углерода фуранозидов химические сдвиги C1 лежат в интервале 103–110 м.д. [8], а константы спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{H1-C1}}$  — в интервале 171–175 Гц [9], можно заключить, что ни один из моносахаридных остатков в ПС1 не находится в фуранозной форме. Из приведенных данных следовало, что в состав повторяющегося звена ПС1 входят четыре гексопиранозы. Судя по величинам констант спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{H1-C1}}$ , лишь одна пираноза (с химическим сдвигом для C1 103,7 м.д.) имеет  $\beta$ -конфигурацию гликозидной связи, тогда как остальные три —  $\alpha$ -конфигурацию [9].

Анализ спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ПС1 показал также, что в составе повторяющегося звена присутствует 6-дезоксисахар (сигнал при 17,9 м.д.), N-ацетиламиносахар (сигнал в области резонанса атомов углерода, связанных с азотом 53,6 м.д., сигналы N-ацетильной группы при 23,3 и 175,7 м.д.) и уроновая кислота (уширенный синглет от карбоксильной группы при 173,7 м.д.). Наличие в спектре сигналов при 61,9 и 61,4 м.д. (триплеты в GD-спектре), характерных для незамещенных оксиметильных групп остатков гексопираноз, указывало на то, что по меньшей мере два гексопиранозных остатка не несут заместителя при C6.

В гидролизате ПС1 (2 М HCl, 100° С, 3 ч) после дезаминирования азотистой кислотой, превращения полученных производных в ацетаты полиолов методом ГЖХ [10] были идентифицированы полные ацетаты сорбита и рамнита в соотношении 1:1, а также небольшое количество ацетата 2,5-ангидроманнита (образовавшегося из 2-амино-2-дезоксиглюкозы). Аналогичный анализ восстановленного по карбоксильным группам [11] полисахарида (ПС2) позволил обнаружить рамнит, 2,5-ангидроманнит и сорбит в соотношении 1:1:2. 2-Амино-2-дезоксиглюкоза в гид-

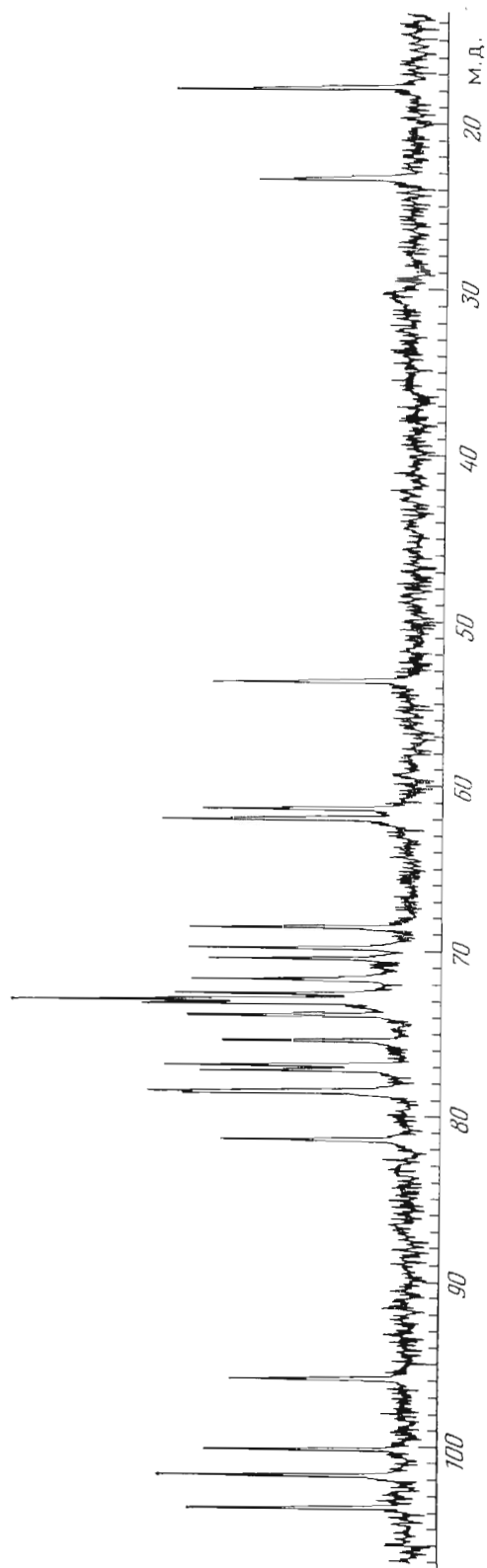


Рис. 1. Сильнополюная область спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР О-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 9

ролизате ПС2 была идентифицирована также с помощью аминокислотного анализатора. Заниженное содержание 2-амино-2-дезоксиглюкозы в гидролизате ПС1 по сравнению с гидролизатом ПС2 обусловлено, по-видимому, наличием устойчивой гликозидной связи между остатками уроновой кислоты и 2-амино-2-дезоксиглюкозы.

Абсолютная конфигурация идентифицированных моносахаридов была определена после их выделения из гидролизата ПС2 (2 М  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 6 ч) хроматографией на бумаге. По величинам оптического вращения глюкоза, глюкуроновая кислота и глюкозамин были отнесены к *D*-ряду. Измерение угла вращения рамнозы, превращенной в метилгликозид (кипячение с 0,1 М  $\text{HCl}$  в метаноле, 2 ч), позволило отнести ее к *L*-ряду.

Таким образом, тетрасахаридное повторяющееся звено полисахарида *S. boydii*, тип 9, построено из остатков *D*-глюкозы, *D*-глюкуроновой кислоты, 2-амино-2-деокси-*D*-глюкозы и *L*-рамнозы. Принимая во внимание данные по моносахаридному составу, два сигнала аномерных протонов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре ПС1 (5,45 и 5,09 м.д.), судя по величине констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{H}_1-\text{H}_2}$ , можно отнести к пиранозам с  $\alpha$ -*D*-глюко-конфигурацией, сигнал 4,97 м.д. — к пиранозе с манно-конфигурацией (рамнозе), а сигнал 4,60 м.д. — к пиранозе с  $\beta$ -*D*-глюко-конфигурацией [12].

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был установлен с использованием метода метилирования и независимо доказан с помощью данных ЯМР-спектроскопии (см. ниже). В метанолизате метилированного по Хакомори [13] ПС1 после ацетилирования в качестве единственного аминсахарного компонента был обнаружен метил-3-О-ацетил-4,6-ди-О-метил-2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-деокси- $\alpha,\beta$ -*D*-глюкопиранозид, характер фрагментации которого под электронным ударом соответствовал описанному ранее [14]. При гидролизе метилированного ПС1 с последующим превращением частично метилированных моносахаридов в ацетаты полиолов были идентифицированы эквивалентные количества 1,3,5-три-О-ацетил-2,4-ди-О-метилрамнита и 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилсорбита. ГЖХ-масс-спектрометрический анализ ацетатов частично метилированных полиолов, полученных из гидролизата метилированного ПС2, позволил идентифицировать те же моносахариды в соотношении 1:2. В гидролизате метилированного и далее восстановленного по метоксикарбонильным группам [11] полисахарида ПС1 наряду с идентифицированными ранее, частично метилированными моносахаридами было обнаружено эквивалентное количество 2,3-ди-О-метил-*D*-глюкозы, образующейся из остатка глюкуроновой кислоты.

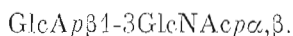
Из приведенных данных следовало, что полисахарид является линейным и в состав повторяющегося звена входят 4-О-замещенные остатки *D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты, а также 3-О-замещенные остатки 2-ацетиамидо-2-деокси-*D*-глюкозы и *L*-рамнозы.

С целью выяснения последовательности моносахаридов в цепи полисахарида ПС1 был подвергнут частичному кислотному гидролизу (0,25 М  $\text{HCl}$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 1,5 ч), основными продуктами которого были, по данным электрофореза на бумаге, два кислых олигосахарида (I и II) с подвижностями  $E_{\text{GalA}}$  0,38 и 0,52. При гидролизе в более жестких условиях (2 М  $\text{HCl}$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 2 ч) с последующим *N*-ацетилированием [15] образуется также кислый олигосахарид (III),  $E_{\text{GalA}}$  0,68. Ионообменная хроматография гидролизатов на колонке с дауэксом 1×8 ( $\text{OAc}^-$ ) в линейном градиенте концентрации уксусной кислоты (0→5%) позволила выделить каждый из олигосахаридов.

Последовательный анализ и сопоставление спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР нативного полисахарида ПС1, восстановленного по карбоксилу полисахарида ПС2, олигосахаридов (I)–(III) и модельных моносахаридов, подобранных в соответствии с данными по моносахаридному составу (таблица), позволили определить все детали структуры ПС1.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахарида (III) представлен тремя сериями сигналов различной интенсивности, характерными для восстанавливающего

дисахарида. Моносахаридный состав дисахарида (III) (с учетом моносахаридного состава ПС1) следовал из наличия в спектре сигнала COOH-группы уроновой кислоты (175,0 м.д.) и двух сигналов суммарной единичной интенсивности в области резонанса атомов углерода, связанных с азотом (54,0 и 56,8 м.д.). Различие в химических сдвигах последних двух сигналов свидетельствовало о том, что остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы находится в олигосахариде на восстанавливаемом конце. В области резонанса аномерных атомов углерода присутствовали четыре сигнала: 104,0; 103,9; 95,9; 92,2 м.д. Первые два (суммарная интегральная интенсивность соответствовала одному атому углерода) принадлежали остатку *D*-глюкуроновой кислоты на невосстанавливаемом конце в дисахаридах с  $\beta$ - и  $\alpha$ -конфигурацией остатка на восстанавливаемом конце. Положение сигналов C1 *D*-глюкуроновой кислоты свидетельствовало о  $\beta$ -конфигурации ее гликозидного центра [16]. Сопоставление спектров метил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозидуроновой кислоты и дисахарида (III) позволило определить все сигналы остатка  $\beta$ -*D*-глюкуроновой кислоты в спектре дисахарида (III) (таблица). Тип замещения в остатке 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкопиранозы в дисахариде (III) определяется при сопоставлении спектров дисахарида (III) и метил-3-О- и 4-О-метил-2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ - и  $\beta$ -*D*-глюкопиранозидов [17]. Выделение в спектре дисахарида (III) сигналов остатков аминсахара с  $\beta$ - и  $\alpha$ -конфигурацией не представляло труда, так как первые образуют (вместе с сигналом 104,0 м.д. от C1 глюкуроновой кислоты) серию сигналов наименьшей интенсивности. Сопоставление спектров доказывало, что остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ , $\beta$ -*D*-глюкопиранозы в дисахариде (III) замещен по C3. Следовательно, дисахарид (III) имеет строение



В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахарида (II) также присутствовали три серии сигналов различной интегральной интенсивности. Число сигналов в области резонанса аномерных атомов углерода (таблица) и их интенсивности показывали, что олигосахарид является трисахаридом. В спектре имелись интенсивные сигналы  $\beta$ -*D*-глюкуроновой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы, а также сигналы *L*-рамнозы, находящейся на восстанавливаемом конце. Необычно сильнополютный сдвиг сигналов C1 остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы (95,7 м.д. в трисахариде с  $\alpha$ -*L*-рамнозой и 95,4 м.д. в трисахариде с  $\beta$ -*L*-рамнозой на восстанавливаемом конце) характерен только для замещения *L*-рамнопиранозы  $\alpha$ -*D*-пиранозой по C3 [17]. Из приведенных данных следовала полная структура трисахарида (II):



Отнесение сигналов остатков *L*-рамнопиранозы с  $\alpha$ - и  $\beta$ -конфигурацией в спектре трисахарида (II) выполнено при сопоставлении спектров трисахарида (II) и  $\alpha$ - и  $\beta$ -*L*-рамнопиранозы с учетом влияния замещения по C3  $\alpha$ -*D*-гексопиранозой [9, 18].

Сопоставление спектров олигосахаридов (I) и (II) показывало, что они различаются только наличием в первом шести дополнительных сигналов, которые, учитывая моносахаридный состав полимера, очевидно, принадлежат остатку  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы. Следовательно, олигосахарид (I) является тетрасахаридом с остатком *L*-рамнопиранозы на восстанавливаемом конце. Поскольку все сигналы остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы и  $\alpha$ -*L*-рамнопиранозы в спектре тетрасахарида (I) и трисахарида (II) практически совпадали, можно сделать вывод, что дополнительный остаток  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы замещает остаток  $\beta$ -*D*-глюкуроновой кислоты. При сопоставлении спектров метил- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозидов, трисахарида (II) и тетрасахарида (I) была идентифицирована серия сигналов, относящихся к остатку замещенной  $\beta$ -*D*-глюкуроновой кислоты в спектре тетрасахарида (I). Среди четырех сигналов, относящихся к атомам C2—C5 этого остатка, не было пиков с химическим сдвигом более 80 м.д., характерных для замещения по C2 или C3 в сахарах

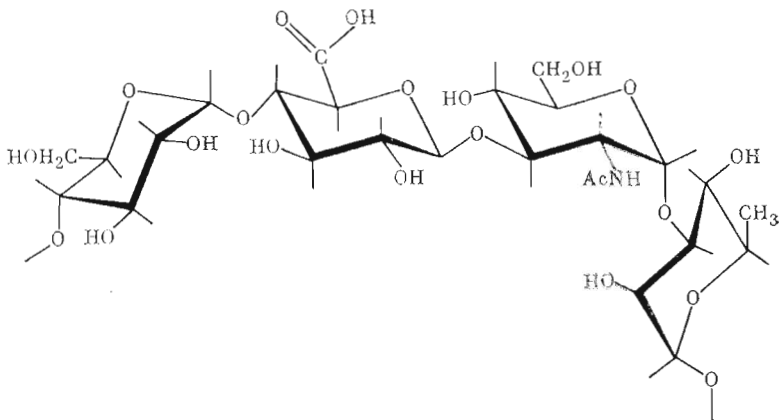
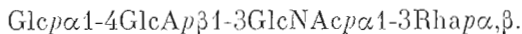


Рис. 2. Структура повторяющегося звена O-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 9

с  $\beta$ -глюко-конфигурацией. Таким образом,  $\alpha$ -D-глюкопираноза замещает остаток уроновой кислоты по C4, а тетрасахарид (I) является линейным:



Замещение по C4 в уроновой кислоте следовало также из сопоставления спектров ПС1 и восстановленного ПС2 (см. ниже). Отнесение сигналов в подспектре остатка  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты выполнено при сопоставлении спектров тетрасахарида (I) и метил- $\beta$ -D-глюкуронопиранозид с учетом эффектов гликозилирования по C4  $\alpha$ -D-пиранозой.

Поскольку тетрасахарид (I) включает в себя все сахара повторяющегося звена полисахарида, для определения структуры последнего достаточно было найти положение замещения в остатке  $\alpha$ -D-глюкопиранозы. На основании сопоставления спектров ПС1 и тетрасахарида (I) были отнесены все сигналы остатков  $\alpha$ -L-рампиранозы,  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты и 2-ацетида-2-деокси- $\alpha$ -D-глюкопиранозы. Среди оставшихся сигналов, относящихся к C2—C4 остатка  $\alpha$ -D-глюкопиранозы, не было пиков с химическим сдвигом  $>80$  м.д., что исключало замещение по C3. Неизменность химического сдвига C1 остатка  $\alpha$ -D-глюкопиранозы в спектрах ПС1 и тетрасахарида (I) свидетельствовала об отсутствии заместителя при C2 в полисахариде. Замещение по C6 было исключено ввиду наличия в спектре ПС1 двух сигналов незамещенных оксиметильных групп (61,4 и 61,9 м.д.). Таким образом,  $\alpha$ -D-глюкопираноза замещена в полисахаридной цепи по C4. Отнесение сигналов этого остатка было выполнено при сопоставлении спектров ПС1 и метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид с учетом эффектов гликозилирования по C4  $\alpha$ -L-пиранозой [9, 18].

Восстановление карбоксильной группы в уроновой кислоте приводит к сильнопольному смещению (на 1–2 м.д.) сигнала C4 в этом остатке и появлению дополнительного сигнала незамещенной оксиметильной группы. Сопоставляя спектры ПС1 и ПС2, можно видеть, что только три сигнала в спектре ПС2 сместились более чем на 0,5 м.д. Так, появился пик с химическим сдвигом 61,7 м.д. вместо пика 173,7 м.д., заметно (на 0,8 м.д.) изменился химический сдвиг C1 остатка  $\alpha$ -D-глюкопиранозы; сигнал при 77,1 м.д. в спектре ПС1 сместился к 75,9 м.д. в спектре ПС2. Последнее изменение характерно для замещенной по C4 уроновой кислоты при ее восстановлении. Заметное смещение сигнала C1  $\alpha$ -D-глюкопиранозы свидетельствовало в пользу присоединения этого остатка к  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоте по C4.

Таким образом, результаты определения характера замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи с использованием  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии полностью совпали с данными анализа методом метилирования. Из всех приведенных выше данных следовало, что специфический полисахарид *Sh. boydii*, тип 9, является линейным и построен из повто-

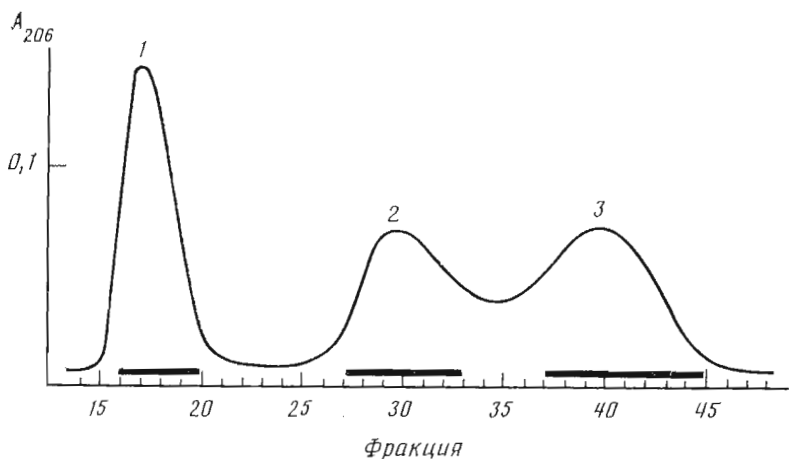


Рис. 3. Фракционирование ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, на сефадексе G-200 (колонка 2,8×70 см) в присутствии дезоксихолата натрия. Объем фракции 7,6 мл

ряющихся тетрасахаридных звеньев, строение которых приведено на рис. 2.

Специфический полисахарид ПС1 обладал высокой серологической активностью в торможении реакции пассивной гемагглютинации (РИГА) (доза 0,2–0,8 мкг/мл), в то время как восстановление по карбоксилу (ПС2) резко снижало его активность (доза 64 мкг/мл). Этот факт указывает на то, что остаток β-D-глюкуроновой кислоты входит в иммунодоминантный участок полисахаридной цепи.

Нами было предпринято также фракционирование ЛПС с помощью хроматографии на сефадексе G-200 в присутствии дезоксихолата натрия [19] с целью химического и серологического изучения различных по молекулярной массе препаратов ЛПС. При гель-хроматографии ЛПС, полученного из супернатанта при ультрацентрифугировании (см. выше) и дополнительно очищенного обработкой рибонуклеазой, дезоксирибонуклеазой и протепиназой К, были получены три фракции (рис. 3). По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 4), вещество, содержащееся во фракции 3 (выход 18%), представляло собой ЛПС с короткими полисахаридными цепями (1–8 повторяющихся звеньев), а фракция 2 содержала ЛПС (выход 47%), в котором O-специфические полисахаридные цепи имели существенно большую длину [7]. Вещество фракции 1 (выход 35%) в геле не обнаружили. При анализе полисахаридной фракции, полученной при мягкой кислотной деградации обоих ЛПС из фракций 2 и 3 (1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 100° С, 1 ч), с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонки TSK G-4000 SW и TSK G-2000 SW) было установлено, что в состав высокомолекулярного ЛПС из фракции 2 входят полисахаридные цепи с молекулярной массой ~30 кДа, тогда как ЛПС с высокой подвижностью при электрофорезе (фракция 3) содержал полисахаридные цепи с молекулярной массой, не превышающей 10 кДа (калибровка колонок по декстранам, Pharmacia). В отличие от ЛПС, описанных выше, вещество, элюирующееся со свободным объемом колонки (фракция 1), не удалось обнаружить при анализе с помощью гель-электрофореза. При хроматографии на сефарозе 4В вещество фракции 1 элюировалось уже с удержанием, что свидетельствовало об отсутствии типичного для ЛПС мицеллообразования в водных растворах. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР вещества фракции 1 содержал все сигналы специфического полисахарида, а также группу пиков малой интенсивности в области, характерной для атомов углерода углеводородной цепи жирных кислот.

Сопоставление данных по жирнокислотному составу обоих ЛПС и вещества фракции 1 (ГЖХ-масс-спектрометрия) показало, что в отличие от ЛПС, которые содержат приблизительно эквивалентные количества

пальмитиновой,  $\beta$ -оксимиристиновой и стеариновой кислот, вещество фракции 1 не содержит  $\beta$ -оксимиристиновую кислоту при соотношении пальмитиновой и стеариновой кислот 1:2. При мягкой кислотной деградации вещества фракции 1 (1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 1 ч) был получен полисахарид с молекулярной массой  $\sim 60$  кДа (данные высокоэффективной жидкостной хроматографии).

При обсуждении того факта, что вещество фракции 1 не было обнаружено с помощью гель-электрофореза, необходимо, с одной стороны, принять во внимание аномально высокую молекулярную массу полисахаридного компонента вещества фракции 1 и отсутствие у него ярко выраженной склонности к мицеллообразованию, а с другой — идентичность структур специфических полисахаридов ЛПС и вещества фракции 1\*. Отсюда, по-видимому, следует заключить, что вещество фракции 1 лишь в незначительной степени способно образовывать мицеллы с додецилсульфатом натрия и поэтому не входит в гель при электрофорезе или легко вымывается из геля в процессе проявления.

Далее нами было предпринято сопоставление серологических характеристик препаратов, выделенных при гель-хроматографии ЛПС, в торможении РИГА [20] между мышинной антисывороткой к суммарному ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, и эритроцитами барана, сенсибилизированными ЛПС. Препараты суммарного ЛПС и его трех фракций проявили одинаково высокую серологическую активность (ингибировали в дозах 0,4—1,6 мкг/мл) и практически не различались.

Таким образом, проведенные исследования выявили ряд необычных свойств наиболее высокомолекулярной фракции ЛПС *Sh. boydii*, тип 9: очень высокую молекулярную массу специфического полисахарида, несклонность к мицеллообразованию и отсутствие  $\beta$ -оксимиристиновой кислоты среди жирных кислот липидной части. Поскольку оксикислоты — обязательные компоненты для всех известных липидов А и могут поэтому служить их характеристическими маркерами [21],

Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, и его фракций (см. рис. 3): 1 — суммарный ЛПС, 10 мкг; 2—4 — фракции 1—3 соответственно. Нагрузка 10 мкг

гликолипид фракции 1, строго говоря, к типичным ЛПС отнесен быть не может. С другой стороны, обнаружение и выделение этого необычного гликолипида поможет наконец прояснить ситуацию с так называемыми К-антигенами шигелл, представляющими собой антигены с О-специфичностью, но отличающимися от классических соматических антигенов [22].

#### Экспериментальная часть

Подробное описание использованных спектральных и химических методов дано в предыдущем сообщении [1].

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе Gilson (Франция) на колонках (7,5×300 мм) с TSK C-4000 SW и TSK C-2000 SW в буфере,

\* Одно из условий проявления ЛПС — наличие в его составе моносахаридов, окисляемых подной кислотой.



Химические сдвиги атомов углерода в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР полисахаридов ПС1 и ПС2, олигосахаридов (I)–(III) и модельных соединений (D<sub>2</sub>O, 80° С)

Соединение	Остаток моносахарида	Химические сдвиги <sup>13</sup> C, м. д. от ТМС **					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
ПС1	(-3GlcNAcα1-	95,9	53,6	81,3	69,8	72,9	61,9
	-3Rhapα1-	101,7	63,5	76,4	71,6	70,4	17,9
	-4Glcα1-	100,0	73,1	73,1	78,8	72,4	61,4
ПС2	-4GlcApβ1-)n	103,7	73,9	78,4	77,1	77,0	173,7
	(-3GlcNAcα1-	95,7	53,7	81,1	69,7	73,0	61,9
	-3Rhapα1	101,8	68,3	76,7	71,5	70,5	17,9
Тетрасахарид (I)	-4Glcα1	100,8	73,0	73,2	78,6	72,9	61,5
	-4GlcApβ1-)n	104,1	74,1	78,3	75,9	77,2	61,7
	Glcα1-	100,0	73,3	74,1	70,5	73,0	61,5
	-4GlcApβ1-	103,8	73,9	78,1	77,1	76,7	174,2
	-3GlcNAcα1-	95,8	53,55	81,3	69,6	72,9	61,7
Трисахарид (II)	(95,4)		(81,7)				
	-3Rhapα	95,05	68,8	76,6	71,7	69,6	18,1
	β	94,7	69,1	78,8	71,4	73,2	17,8
	GlcApβ1-	103,95	73,9	76,6	73,0	76,6	175,2
	-3GlcNAcα1	95,7	53,6	81,65	69,6	72,75	61,7
Дисахарид (III)	(95,4)						
	-3Rhapα	95,05	68,8	76,6	71,7	69,7	18,1
	β	94,7	69,1	78,7	71,4	73,2	18,1
	GlcApβ1-	103,9	73,9	76,8	72,6	76,7	175,0
	(104,0)						
	-3GlcNAcα	92,2	54,0	81,9	70,0	72,6	61,9
β	95,9	56,8	84,3	70,0	76,7	62,1	
GlcApβ1-OMe	104,3	73,8	76,7	72,4	75,7	174,4	
GlcNAcα1-OMe	99,6	53,4	81,8	70,5	72,9	61,9	
3MeGlcNAcαβ1-OMe	102,9	55,0	84,2	70,0	77,0	62,0	

\* Хим. сдвиги  $\text{CH}_2\text{CON} - 23,3-23,4$  м. д.,  $\text{CH}_3\text{CON} - 175,4-176,0$  м.д.

\*\* В скобках хим. сдвиги соответствующих атомов углерода олигосахаридов с β-пиранозой на восстанавливающем конце.

содержащем 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc, при скорости элюции 0,5 мл/мин; детектирование – по поглощению в УФ-свете (Uvicord SII, 206 нм) и изменению показателя преломления («Рефрактометр 131»).

**Серологические методы.** Антисыворотку к ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, получали иммунизацией мышей (СВА×С57BL/6) F<sub>1</sub> внутривенно (дважды с интервалом 3 нед) раствором ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, в дозах 10 мкг/мышь. Сыворотку получали на 7-е сут после второй иммунизации. Активность антисывороток тестировали в РИГА с эритроцитами барана, сенсибилизированными ЛПС *Sh. boydii*, тип 9, по общепринятой методике [23].

**Выделение специфического полисахарида.** 40 г сухих бактериальных клеток *Sh. boydii*, тип 9, экстрагировали 30 мин при 68° С в 1,4 л 45% водного фенола, диализовали против проточной и далее дистиллированной воды, упаривали до 400 мл. Половину полученного раствора обрабатывали цветолоном по стандартной методике [5]. Получили 2,01 г ЛПС (выход 10,1%). Оставшиеся 200 мл сырого экстракта при 5–10° С подкисляли уксусной кислотой до pH 3,4. Выпавший осадок нуклеиновых кислот отделяли при 4° С центрифугированием при 10 000g, а супернатант лиофилизовали. Выход ЛПС составил 2,3 г (11,5%). Очищенный обоним способами ЛПС объединяли и ультрацентрифугировали (1% раствор) при 105 000g в течение 6 ч. Получили (после лиофилизации) 1,12 г осадка и 3,19 г супернатанта (соответственно 2,8 и 8,7 % от веса сухих клеток).

Раствор 2,1 г ЛПС в 200 мл 1% CH<sub>3</sub>COOH нагревали 1,5 ч при 100° С, отщепившийся липид А отделяли центрифугированием в течение 6 ч при 105 000g, а супернатант лиофилизовали и хроматографировали на сефадексе G-50; получили 760 мг ПС1, выходящего с удерживаемым объемом колонки. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +29° (с 1; вода). E<sub>540</sub> 0,3.

**Восстановление полисахарида** по карбоксильным группам осуществляли по методике [11] и очищали на колонке с сефадексом G-50. Выход ПС2 95%.

**Определение моносахаридного состава.** По 5 мг ПС1 и ПС2 гидролизовали 2 М HCl (100° С, 3 ч), упаривали и идентифицировали методом ГЛХ нейтральные сахара одновременно с аминоксахарами после дезаминирования последних, как описано ранее [10]. 30 мг ПС2 гидролизовали в 10 мл 2 М CF<sub>3</sub>COOH (100° С, 6 ч). Из гидролизата после упаривания препаративной хроматографией на бумаге были выделены L-рамноза, D-глюкоза и D-глюкозамин. Последний был нанесен для дополнительной очистки на колонку (1×7,5 см) с катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>) в воде и элюирован 0,5 М HCl (10 мл) после удаления нейтральных примесей промыванием колонки 30 мл воды.

**Анализ полисахарида методом метилирования.** 20 мг высушенного над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ПС1 метилировали по методу Хакомори [13]. Выделение, очистку и анализ частично метилированных производных моносахаридов проводили как описано ранее [1].

15 мг метилированного ПС1 восстанавливали по карбметоксигруппам боргидридом натрия в боратном буфере (см. выше), а затем нагревали 2 ч с 2 мл 85% HCOOH при 100°С, упаривали, остаток нагревали 16 ч с 2 мл 0,25 М HCl. Гидролизат восстанавливали боргидридом натрия (4 ч), обессоливали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>), удаляли борную кислоту упариванием с метанолом, остаток ацетилювали (пиридин – уксусный ангидрид, 100°С, 30 мин) и исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

*Частичный кислотный гидролиз полисахарида.* 20 мг ПС1 нагревали 1,5 ч с 50 мл 0,25 М HCl при 100°С. Гидролизат лиофилизировали и наносили на колонку (0,8×20 см) с дауксом 1×8 (ОAc<sup>-</sup>). Нейтральные компоненты элюировали 50 мл воды, а затем в линейном градиенте CH<sub>3</sub>COOH (0→5%) были выделены тетрасахарид (I) (30 мг, E<sub>GalA</sub> 0,38) и трисахарид (II) (21 мг, E<sub>GalA</sub> 0,52).

100 мг ПС1 нагревали 2 ч с 3 мл 2 М HCl при 100°С. Гидролизат после упаривания подвергали N-ацетилюванию [15] и далее хроматографию на колонке с анионитом (см. выше). Выход дисахарида (III) (E<sub>GalA</sub> 0,68) составил 9 мг.

*Фракционирование ЛПС.* Для дополнительной очистки 50 мг ЛПС растворяли в 5 мл буфера, содержащего 0,05 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> (pH 7,8), и инкубировали 16 ч при 37°С с рибонуклеазой А и дезоксирибонуклеазой I (Serva, ФРГ) в концентрациях 1 мкг/мл, а затем 3 ч с 0,5 мг протеиназы К (Serva, ФРГ). Очищенный препарат диализовали против дистиллированной воды, дополнительно очищали гель-хроматографией на колонке с сефарозой 4 В и лиофилизировали. Выход 48 мг.

Раствор 45 мг ЛПС в 8 мл буфера, содержащего 0,2 М NaCl, 0,25% дезоксихолат натрия, 1 мМ EDTA и 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), нагревали 1 ч при 56°С, а затем наносили на колонку (2,8×70 см) с сефадексом G-200, уравновешенным тем же буфером [19]. Хроматографию проводили при скорости элюции 0,38 мл/мин, детектирование – по поглощению при 206 нм (Uvicord SII). Объем собираемых фракций 7,6 мл. Фракции объединяли (рис. 4) и диализовали 2 сут против элюирующего буфера, но не содержащего дезоксихолата при 37°С, затем 2 сут против дистиллированной воды и лиофилизировали. Выходы фракций 1–3 соответственно составили 15,8 мг (35%), 21,1 мг (47%) и 8,1 мг (18%).

Растворы полученных фракций (1 мг фракции 1; 2 мг фракции 2; 3 мг фракции 3) в 0,5 мл 1% CH<sub>3</sub>COOH нагревали 3 ч при 100°С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 15 000g, а супернатанты, содержащие соответствующие полисахариды, лиофилизировали и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Навески фракций ЛПС (10 мг фракции 1; 6 мг фракции 2; 3 мг фракции 3) кипятили 3 ч с 1 мл 1 М HCl в абс. метаноле. Метанолиты упаривали, метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном (3×1 мл) и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в сравнении с известными образцами.

Авторы выражают благодарность М. Н. Славину за помощь в проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Львов В. Л., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н., Лапина Е. Б., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1008.
2. Nowohty A. // Handbook of Endotoxins / Ed. Rietschel E. T. Elsevier Sci. Publ. B. V. 1984. P. 308–338.
3. Grossman N., Leive L. // J. Immunol. 1984. V. 132. № 1. P. 376–385.
4. Joiner K. A., Schmetz M. A., Goldman R. C., Leive L., Frank M. M. // Infect. Immun. 1984. V. 45. № 1. P. 113–117.
5. Westphal O., Jahn K. // Methods Carbohydr. Chemistry / Eds Whistler R., Bemiller J. M. N. Y. – L.: Acad. Press, 1965. P. 88–91.
6. Tsai C.-M., Frasch C. E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. № 1. P. 115–119.
7. Palva E. T., Mäkelä P. H. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 137–143.
8. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
9. Bock K., Lundt I., Pedersen C. // Tetrahedron Lett. 1973. № 13. P. 1037–1040.
10. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Львов В. Л., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Хоменко Н. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1971. № 5. С. 1168–1172.
11. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 10. С. 2335–2338.
12. Altona C., Hassnoot C. A. C. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417–429.
13. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлиг А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–278.
14. Dmitriev B. A., Bakhinovskiy L. V., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hoffman I. L. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 78. № 2. P. 381–387.
15. Danishefsky I., Eiber H. B., Carr J. J. // Arch. Biochem. and Biophys. 1960. V. 90. № 1. P. 114–119.
16. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495–1505.
17. Шашков А. С. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 246–253.
18. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1984. V. 42. P. 193–225.
19. Peterson A. A., McGroarty E. J. // J. Bacteriol. 1985. V. 162. № 2. P. 738–745.
20. Sachs D. H., El-Gamil M., Miller C. // Eur. J. Immunol. 1981. V. 11. № 6. P. 509–516.
21. Galanos C., Lüderitz O., Rietschel E. T., Westphal O. // International Review of Bio-

- chemistry. *Biochemistry of Lipids II*/Ed. Goodwin T. W. Baltimore: University Park Press, 1977, V. 14. P. 239-335.
22. Тимаков В. Д., Петровская В. Г., Бондаренко В. М. Биологические и генетические характеристики бактерий рода *Shigella*. М.: Медицина, 1980. С. 84-89.
23. Иммунологические методы/Ред. Фринель Х. М.: Мир, 1979. С. 113-115.

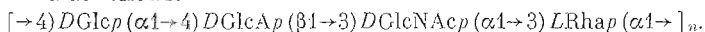
Поступила в редакцию  
7.1.1987

**BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF SHIGELLA.  
STRUCTURE OF THE POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *SHIGELLA*  
*BOYDII* TYPE 9 LIPOPOLYSACCHARIDE AND DETECTION  
OF AN UNUSUAL HIGH-MOLECULAR WEIGHT GLYCOLIPID**

L'VOV V. L., MUSINA L. Yu., SHASHKOV A. S.\*,  
ERMAKOV G. P., DMITRIEV B. A.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR: \* N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Specific acidic polysaccharide has been isolated from the *Shigella boydii* type 9 antigenic lipopolysaccharide after mild hydrolysis followed by chromatography on Sephadex G-50. The polysaccharide consists of *D*-glucose, *D*-glucuronic acid, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, and *L*-rhamnose. From the results of methylation analysis, partial acid hydrolysis and <sup>13</sup>C NMR data the structure of the repeating unit of the polysaccharide was deduced as follows:



The lipopolysaccharide from *Sh. boydii* 9 was fractionated by gel chromatography on the Sephadex G-200 column in a buffer containing sodium deoxycholate into three fractions. PAGE-SDS of the fractions obtained, <sup>13</sup>C NMR- and chromato-mass-spectrometry data indicated that the three fractions contained the O-specific polysaccharide as the only carbohydrate component. The substance from the most high-molecular weight fraction contained unusually long O-specific chains (60 000 dalton). In the fat acid composition this fraction differed from other lipopolysaccharides by absence of  $\beta$ -hydroxy-myristic acid.